U.A de Biología Molecular y Genética

TRABAJO PRÁCTICO 5

Objetivos específicos del Trabajo Práctico:

- Identificar y explicar los mecanismos moleculares implicados en la regulación del ciclo celular y su relación con la acción de factores de crecimiento
- Explicar el rol de las señales extracelulares (factores de crecimiento) en la regulación del ciclo vital de las células de un tejido, considerando que las mismas actuan en forma combinatoria participando en efectos diversos (proliferación, diferenciación, sobrevida) y que su ausencia puede desencadenar muerte o senescencia
- Explicar el concepto de punto de restricción, Punto de control
- Explicar el concepto de genética
- Explicar los conceptos de genes supresores de tumores y protooncogenes y reconocer ejemplos en el proceso de regulación del ciclo vital de las células
- Entender conceptos de herencia clásica aplicados a casos de genética forense
- Relacionar la segunda ley de Mendel (principio de segregación) con los procesos de meiosis y fecundación para entender cómo funciona la herencia de material genético de una generación a la siguiente
- Estudiar el funcionamiento la presión evolutiva y la herencia en secuencias codificantes y no codificantes
- Aplicar los fundamentos de las técnicas moleculares para la detección de variantes alélicas en el contexto del diagnóstico genético de entidades monogénicas

Objetivos generales del Trabajo Práctico:

- Comprender y aplicar los conceptos fundamentales de Biología Molecular y Genética a situaciones experimentales y clínicas, integrando el análisis del ciclo celular, la genética de enfermedades mendelianas y las aplicaciones de la genética forense

PARTE I – CICLO CELULAR

En un trabajo experimental se planteó como objetivo investigar el efecto del factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) sobre el comportamiento de células del hipocampo (área del cerebro relacionada son los procesos de aprendizaje). Para tal efecto, se obtuvieron células de esta región del SNC de embriones de rata y se las mantuvo en cultivos celulares en cápsulas de Petri (cultivos primarios de células del SNC). A 10 cápsulas se las trató con FGF2 (grupo tratado o experimental) y a otras 10 no (grupo control). A ambos grupos se le agregó el marcador BrdU, que es un análogo de timidina. Desde el inicio del tratamiento y cada dos días hasta el día 8, se fueron fijando 2 cápsulas de cultivos celulares por grupo (2 cápsulas del grupo tratado y 2 cápsulas del grupo control). A cada cápsula fijada se le realizó una técnica de inmunocitoquímica con un anticuerpo primario anti-BrdU y un anticuerpo secundario marcado con plata. Se observaron los cultivos con dos modalidades de microscopía óptica: contraste fase para observar todas las células y discriminar su morfología (Figura 1.A y B) y con campo claro para observar las células que habían captado BrdU (Figura 1C y D). Se contó el número total de células (Figura 1.E) y la proporción de células marcadas con BrdU (Figura 1.F) al principio del experimento y cada 2 días, durante 8 días de cultivo. Con estos datos analice y responda las siguientes preguntas:

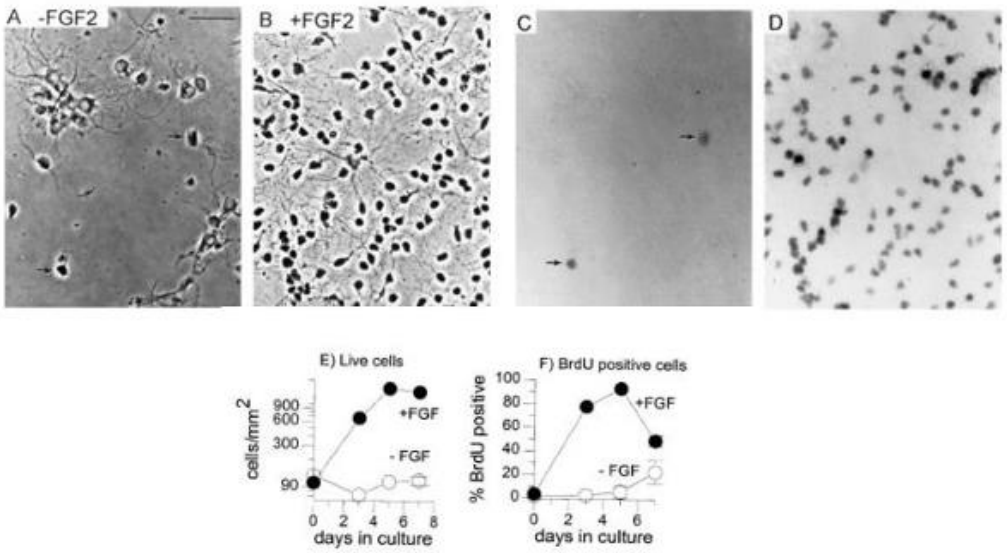


Figura 1. A-D. Microfotografías ópticas de células de hipocampo luego de 8 días en cultivo. A y B Microfotografías tomadas con contraste de fase para observar la morfología y el número total de células sin colorear. Cy D. Microfotografías tomadas en campo claro para observar las células marcadas con inmunocitoquímica anti-BrdU. A y C corresponden al grupo control y B y D corresponden al grupo tratado con FGF2. E. Gráfico que representa el número de células por mm2 de superficie en las dos condiciones durante 8 días de cultivo. F. Gráfico que representa el porcentaje de células marcadas con BrdU durante 8 días de cultivo.

1. **Observar la figura 1A y B:**
    a. ¿Qué interpretan de la comparación de las figuras 1A y B?
    b. ¿Qué mecanismo celular que participó en este efecto?

2. **Explique los mecanismos moleculares mediante los cuales el FGF2 produce el efecto celular mencionado en la pregunta anterior**
    a. ¿Cuál es el lugar de unión del FGF2?
    b. ¿Cuál etapa del ciclo celular en la que tiene efecto? G1 → S : punto de restricción
    c. ¿Es necesaria la presencia de FGF2 una vez que las células han ingresado a la fase S?

PARTE II – INTRODUCCION A GENETICA

La Fibrosis quística constituye una patología multisistémica producto de la alteración en el transporte de iones en las células epiteliales. Afecta principalmente, a la secreción de las glándulas exocrinas y a los epitelios de los aparatos respiratorio, digestivo y reproductor. Los individuos que padecen de la enfermedad poseen en su genoma dos variantes alélicas patogénicas del gen involucrado, heredadas por vía materna y paterna respectivamente. En el año 1989 puedo determinarse que el gen involucrado en esta patología codifica un canal iónico que fue denominado CFTR1 (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator: Regulador transmembrana de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística).

Variante alélica wild type: El locus del gen CFTR está ubicado en 7q31.2; presenta una longitud de 230 kb, contiene 27 exones. Su producto es un ARNm de 6.5 kb, que es traducido en la proteína canal cftr. Esta proteína es transportada a la membrana plasmática y está involucrada en el transporte de iones Cl- y HCO3- , y en la regulación de múltiples canales iónicos (entre ellos Canal epitelial de sodio: ENac); en consecuencia, participa en diferentes procesos celulares (Ej.: respuestas celulares a AMPc; transporte de cloruros; modificación del pH intracelular; hiperpolarización de membrana, exocitosis, entre otros).

Variantes alélicas patogénicas: Desde su identificación, se han descripto alrededor de 1.900 variantes de secuencia (mutaciones) del gen CFTR. Los tipos de mutaciones que se relacionan con fenotipos clínicos enfermos son mayormente: mutaciones sin sentido (corren el marco de lectura produciendo codones de terminación prematuros), mutaciones en sitios que regulan procesos de splicing (ARNm más cortos o con estructura inestable, conlleva a una alta velocidad de degradación sin traducción); o mutaciones con cambio de sentido (cambian la secuencia aminoacídica alterando la estructura/función proteica). Estos tipos de

mutaciones generan desde un punto de vista funcional celular pérdida de función (alelos nulos o alelos hipofuncionantes). La mutación más prevalente en afectados es c.1521-1523delCTT// p.Phe508del (mutación que a nivel del ADN representa la pérdida de 3pb entre los nucleótidos 1521-1523 (CTT) del exón 10 y a nivel proteico se expresa como la ausencia del aminoácido fenilalanina en la posición 508, generando un defecto en el plegado proteico que altera su transporte a su localización definitiva en la membrana plasmática, comportándose como un alelo nulo. Esta mutación presenta una prevalencia del 70% en población de Europa del norte. En Argentina también es la mutación más frecuente con una prevalencia del 59% en los afectados.

1. **Definir, según la bibliografía recomendada, los siguientes conceptos:**

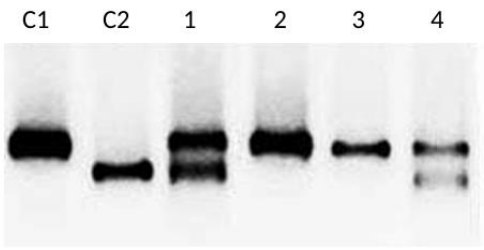
Alelo	
Células germinales	
Células somáticas	
Cromosoma	
Cromosoma autosómico	
Cromosoma sexual	
Fenotipo	
Genoma	
Genotipo	
Gen	
Locus	
Mutación	
Variantes	

Presentación del caso:

Una niña de 8 años presenta signos compatibles con fibrosis quística, pero el diagnóstico basado en signos clínicos es controversial. Se decide realizar una prueba de diagnóstico molecular para determinar la presencia de la mutación p.Phe508del. La prueba consiste en amplificar mediante PCR una región del gen que contiene el triplete CTT del exón 10. Los productos de amplificación se resuelven luego en un gel de poliacrilamida.

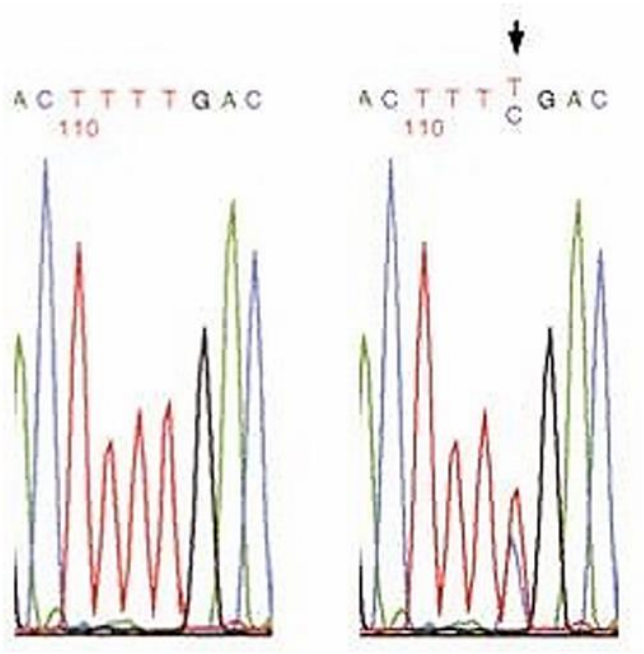
2. **Compare las fases-procesos de desnaturalización, hibridación, y extensión de la PCR con la replicación in vivo en eucariotas**

3. **A continuación, se muestra el resultado de la prueba molecular de los miembros de la familia y de la niña con diagnóstico presuntivo de fibrosis quística (probando):**
    a. Interprete el patrón de bandas para cada individuo de la familia. ¿Pude explicarse el diagnóstico clínico del probando con esta prueba?



C1, C2: controles (individuos de genotipo conocido)
1: padre del probando
2: madre del probando
3: hermano del probando
4: probando

A continuación, se decidió secuenciar el gen CFTR en los miembros de la familia utilizando el método de secuenciación de Sanger. Se detectó una variación respecto de la secuencia wild type, en la posición 113 del exón 3. Esta mutación fue hallada en muestras de la madre y del probando, pero no en muestras del padre y del hermano del probando. A continuación, se muestra el fragmento de la secuenciación que compara la secuencia wild type (izquierda) y la mutada (derecha):



4. **Observe los fragmentos de la secuenciación. ¿Por qué hay un 'doble pico' en la posición en dónde se observa la mutación?**

5. **¿Explica la mutación hallada el diagnóstico clínico de fibrosis quística? Justifique**

PARTE III – GENÉTICA FORENSE

Marta Taboada nació el 5 de agosto de 1945 en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Estudió la carrera de abogacía en la Facultad de Derecho y Ciencias Sociales de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA). Contrajo matrimonio y tuvo tres hijos, Andrés, Juan y Santiago Dillon y una hija, Marta Dillon. A comienzos de 1976 Taboada comenzó su colaboración con la Comisión Argentina de Derechos Humanos (CADHU). Una de sus tareas principales fue la de ayudar a salir del país a militantes que escapaban del aparato represivo, por lo que a tales fines realizó numerosos viajes a lugares de frontera. El 28 de octubre de 1976 Marta, embarazada de mellizos de 7 meses, fue secuestrada frente a sus cuatro hijos. Poco más se supo de ella en los siguientes años. En el año 2011 aparecen los restos de varias personas NN en un cementerio y frente a la sospecha de que algunos de ellos podrían corresponder a Marta, la Cámara Nacional de Apelaciones en lo Criminal y Correccional Federal de la Capital Federal autoriza al Equipo Argentino de Antropología Forense (EAAF) a identificar esos huesos. Para ello se contactó a los hijos de Marta, dado que con un examen de filiación se podría determinar si esos restos correspondían a los de su madre. Hay regiones polimórficas del genoma conocidas como repeticiones cortas en tándem (STRs). Estas son secuencias

cortas de ADN que se repiten varias veces y varían mucho entre individuos, lo que los convierte en excelentes marcadores para estudios de filiación. En la actualidad se analizan entre 15 y 21 loci de STR en pruebas de paternidad estándar. Estos loci están ubicados en diferentes cromosomas, se heredan de ambos padres y no corresponden a secuencias codificantes, lo cual les otorga una gran variabilidad interindividual. Comparando los STRs de los individuos involucrados, los científicos pueden determinar si los patrones coinciden y confirmar la filiación con un 99,9% de certeza. Actualmente, tanto en la EAAF como en el Banco nacional de datos genéticos (BNDG), se utiliza una batería de métodos distintos para corroborar la filiación con más del 99% de certeza. Uno de estos métodos es la PCR Amp FLP, que utiliza una batería de primers dirigidos a distintos loci. Para evaluar si efectivamente esos restos correspondían a la madre de Andrés, Juan, Santiago y Marta, se extrajo el ADN de todos ellos así como de los restos óseos y se realizó una PCR multiplex con electroforesis capilar. Las gráficas mostrarían picos fluorescentes en diferentes posiciones (correspondientes al tamaño de los fragmentos de ADN) y de diferentes colores (según los fluoróforos utilizados en los cebadores). La interpretación visual se basa en la comparación de los picos entre los carriles de los dos individuos. En este taller, los resultados se presentan en formato de tabla, resumiendo la información obtenida de la comparación de los picos. Para facilitar la comprensión de los resultados, se muestran únicamente los análisis de sólo uno de sus hijos, Andrés Dillon

A continuación, se brindan los resultados de la electroforesis capilar en formato de tabla para facilitar su comprensión:

Loci STR	Restos Óseos		Andres	
	Alelo 1 (n° de repeticiones)	Alelo 2 (n° de repeticiones)	Alelo 1 (n° de repeticiones)	Alelo 2 (n° de repeticiones)
D21S11	14	30	14	28
D3S1358	15	15	16	15
FGA	22	25	22	24
TH01	6	9	7	6
vWa	13	20	13	15
D8S1179	6	8	8	18
D18S51	20	12	12	22
D5S818	5	10	8	9
D7S820	10	12	9	10
D13S317	8	5	7	8
D16S539	20	24	12	20
CSF1PO	13	15	17	15
TPOX	13	20	13	18

1. **¿Qué es la PCR multiplex y por qué resulta útil en estudios de genética forense?**

2. **¿Qué son los loci STR y por qué se utilizan en pruebas de identificación y filiación?**

3. **¿Por qué es necesario analizar varios loci STR en lugar de solo uno o dos?**

4. **¿Qué es un polimorfismo en términos genéticos? Relacione el concepto de polimorfismo con huella genética y su importancia en la identificación forense**

5. **Teniendo en cuenta que cada individuo hereda un alelo de cada progenitor, ¿cómo se puede inferir la contribución materna en los alelos de Andrés comparando con los restos óseos?**
6. **Observando los loci D21S11 y FGA, ¿qué evidencias indican que los restos óseos podrían corresponder a la madre de Andrés?**

7. **¿Hay algún locus en la tabla en el que no se observe coincidencia entre Andrés y los restos óseos? ¿Qué podría significar esto?**

8. **¿Cuál es la importancia del Banco Nacional de Datos Genéticos (BNDG) en Argentina?**

9. **¿Qué dilemas éticos pueden surgir en la utilización de datos genéticos para identificar personas desaparecidas?**